

해양에서 용균효소를 분비하는 균주의 분리와 동정

진성현* · 류병호

부산광역시 보건환경연구원, 경성대학교 식품공학과

Isolation and Identification of a Bacteriolytic Enzyme-producing Bacterial Strain from Pusan Coastal Sea

Sung-Hyun Jin* and Beung-Ho Ryu

Public Health Environment Institute of Pusan, 613-104, Korea

Department of Food Microbiology and Technology, Kyung Sung University, Pusan 608-736, Korea

Abstract — In order to produce the bacteriolytic enzyme, bacterial strains capable of excreting a large amount of the enzyme were screened from the coastal sea water samples in Pusan. The bacterial strain SH-1, which showed the highest activity among 43 bacteriolytic enzyme producing bacteria, was finally selected for further studies. The strain SH-1 was an endospore-forming gram-positive rod, and the position of spore was paracentral. These morphological characteristics assigned the isolated strain to the morphological group I classified by Gordon. The fatty acid composition of the bacterial stain was analyzed to be consisted of branched chains of iso-Cn and anteiso-Cn. Based on the percent content of the branched chain (93.85%), the isolates could be identified as a species of *Bacillus*. According to the experimental results of the API system (API 50CHB & API 20E) the strain was identified as *Bacillus subtilis*. Numerical taxonomy, in which 82 major characters were examined using several species of *Bacillus* as the standard bacteria, indicated that the strain SH-1 showed 90% similarity to *Bacillus subtilis*. Thus, the isolated strain SH-1 could be identified as *Bacillus subtilis*.

용균효소(Bacteriolytic enzyme)란 세포벽이나 세포 표층구조에 작용하여 최종적으로 세포를 용해하는 작용이 있는 효소를 말한다. 용균효소는 그 작용 부위에 따라 peptidoglycan의 glycan 부분에 작용하는 endo β -1,4 N-acetyl hexosamidase, glycan 부분과 peptide 부분을 연결하는 N-acetyl muraminy L-alanine amidase 및 peptidoglycan의 peptide 결합에 작용하는 endopeptidase 등이 있다(1). 해저 퇴적물 중에는 비교적 수심이 낮은 10~30 m 정도의 내만으로부터 수심 3,000~4,000 m의 외양(外洋)지역에 이르기까지 용균효소 생산균이 다수 존재하며 그 균수는 종속영양세균의 약 12% 정도이다(2). 해양의 용균효소 생산 세균으로는 해수중의 *Pseudomonas*, *Vibrio* 및 *Flavobacterium* 등이 있고 해저 퇴적물 중에는 *Bacillus* sp.가 많다(3). 해안 연안 및 외양의 해저 퇴적물에서 분리한 용균 효소 생산균 482주의 약 77~94%가 *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus enteritidis*, *Staphylococcus au-*

reus, *Bacillus subtilis* 등의 가열사세포(加熱死細胞)를 용해하고 약 5~20%는 *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* sp. 등의 생세포(生細胞)를 용해하는 능력이 있어 광범위한 세균세포에 작용하는 것으로 알려져 있다(3). 본 연구는 해양세균이 분비하는 용균효소를 이용하여 저온에서 보관되는 식품 및 어패류등에 대한 보존료로서의 이용 가능성과 냉장보관시 저온에서도 생육하는 *Listeria*균의 오염방지 및 어패류 섭취로 인한 세균성 식중독 예방에 대한 이용 가능성을 찾고자 우선 해양에서 용균효소를 분비하는 균주를 분리 동정하였다.

재료 및 방법

균원 시료

부산 연안의 해수를 채수하여 세균 세포벽을 용해하는 균주의 분리를 위한 시료로 사용하였다.

배지 및 시약

일반기초 배지는 Difco 제품을 구입 사용하였고 ba-

Key words: Bacteriolytic enzyme, *Bacillus subtilis*
*Corresponding author

cteriolytic enzyme의 기질로 사용된 *Micrococcus lysodeikticus*(ATCC No. 4698)는 Sigma Co.(U.S.A.) 제품을 사용하였다. 분리균주의 생화학적 특성시험에 이용된 API kit system은 bio Merieuxsa(France)의 제품을 사용하였으며 균체의 지방산 조성분석을 위한 Trypticase Soy Broth는 BBL제품(U.S.A.), Methyl-tert butyl ether는 Aldrich사(U.S.A.) 제품을 사용하였다.

Bacteriolytic enzyme 생산 미생물의 분리

세균세포벽을 용해하는 효소를 생성하는 균주의 분리는 70°C water bath에서 20분간 열처리한 시료 0.1 ml씩을 분리용 배지(0.5% polypeptone, 0.5% yeast extract, 0.1% *M. lysodeikticus*, 1.5% Agar, pH 8.0)에 균일하게 도말하여 30°C에서 3~4일간 배양한 후 집락 주변에 나타나는 투명한 생성유무를 확인함으로써 세균 세포벽 용해활성이 있는 균주를 1차 선별하였다(2, 3)

세포벽 용해 활성의 측정

세포벽 용해 활성 측정을 위한 기질은 동결건조된 *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698(Sigma Co.)을 사용하였으며 활성 측정은 Sugahara 등(4)의 방법을 따랐다. 즉, 기질로 사용된 동결건조 균체액(0.2 g dry cells/100 ml D.W)을 100°C에서 10분간 처리한 균액 1 ml와 0.05M Tris-HCl buffer(pH 7.0) 1 ml 및 배양상등액 1 ml를 혼합하여 35°C 항온조에서 30분간 반응시킨 후 흡광도 감소를 570 nm에서 측정하였으며 이때 효소 활성도 1 unit는 다음과 같은 식에 의해

$$\text{Bacteriolytic activity} = \frac{\text{OD}_{570}(\text{initial}) - \text{OD}_{570}(\text{final})}{\text{OD}_{570}(\text{initial})} \times 100$$

30분간 반응으로 570 nm에서의 흡광도를 1.0% 감소를 일으키게 하는 효소의 양으로 하였다.

형태적 특성

선정된 균주의 세포 형태와 집락의 특징은 면양혈액 한천배지와 Nutrient agar 배지상에서 30°C에서 24시간동안 배양한 후 용혈대 형성 유무와 colony의 형태 및 표면의 특징을 관찰하였다. 세포의 협막은 india ink법(5)으로 확인하였고, 편모염색은 Leifson 변법(6)에 따라 광학 현미경으로 관찰하였다. 또한 transmission electron microscopy(TEM), JEOL 1200 EX-II(일본)를 이용하여 형태학적 특징을 검토하였다.

지방산 조성

균체의 지방산조성 분석은 Trypticase Soy Agar (BBL)에서 28°C, 24시간 배양한 40~50 mg의 균체를 취하여 1N NaOH(50% methanol) 1 ml에 현탁한 후 30분간 끓여서 비누화 하였다. 여기에 6N HCl(46% Methanol) 0.5 ml를 넣고 10분간 끓여 Methylation 시킨 다음 추출용매(hexane : methyl-tert butyl ether = 1 : 1) 1.25 ml를 가하여 가볍게 진탕하여 용매층을 회수한 후 여기에 0.3N NaOH 3 ml를 가하여 가볍게 진탕하여 용매층을 회수하였다. 이것을 균체의 지방산 분석용 시료로 하여 Gas chromatography(Hawellett-packard 5898A, Ultra-2, FID detector, oven temp. 270°C, detection temp. 300°C, injection temp. 250°C)로 분석하였다(7, 8).

생화학적 성상조사

생화학적 성질 및 탄수화물자화성은 Biochemical tests for identification of medical bacteria(9) 및 Manual for the identification of medical bacteria(10)와 Sneath가 제시한 방법(11)으로 실시하였다. 또한 *Bacillus*속 세균 동정은 상품화 된 Kit인 ATB 50CHB와 API 20E(API bioMerieux sa)를 이용하여 kit system에 따라 조작하였고 판독은 ATB Computer data base version 2.0을 이용하였다.

생화학적 분류법(biochemical taxonomy)

지방산 조성 관찰 및 생화학적 성상을 이용한 분리균주의 동정 및 분류는 Cowan과 Steel(10), Sneath(11), Gordon 등(12), Logan과 Berkely(13, 14), Keneman 등(15), Turnbull 등(16), Priest 등(17, 18) 및 ODonnel 등(19)의 연구를 참조하였고, API Kit system은 ATB computer data base의 similarity%로 나타내었으며, 지방산 조성에 의한 동정 및 분류는 Abel 등(7), Goodfellow와 Minnikin 등(20), Kaneda 등(21, 22), Niskaman 등(23)의 연구를 참조하였다.

수리적 분류법(numerical taxonomy)

예비실험을 통하여 본 실험의 선정균주와 유사하다고 판단되는 *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus megaterium* ATCC 25848, *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 23845, *Bacillus licheniformis* ATCC 21037과 선정 균주에 대한 형질 분석 결과인 82가지의 인자를 가지고 2 진수형태(binary form. positive results=1, negative results=0)로 처리하였다. 각 균주간의 유사도지수는 유사지수 산출에 가장 많이 사용하는 Jaccard 지수를 이용하여 유사지수 행렬(similarity index matrix)을 구하였으며

(24, 25) Jaccard 지수(Sj)의 산출식은 다음과 같다.

$$\text{Jaccard coefficient}(S_j) = \frac{a}{a+b+c}$$

a ; corresponds to the number of positive matches

b and c ; represent the number of non-matching characters between pairs of operational taxonomic units.

유사도의 수지도(dendrogram) 작성을 위한 프로그램은 "Statistical Ecology. A primer on methods and computing"(26) 내의 CLUSTER. BAS프로그램의 일부를 변형 조합시켜 Q basic으로 작성된 program으로 분석 처리한 결과를 백분율(%)로 나타내었다.

결과 및 고찰

Bacteriolytic enzyme 생성균주의 분리 및 선정

부산 연안에서 채수한 약 190시료의 해수를 분리 용배지에 도말하여 배양한 후 집락주변에 투명한이 나타나는 43주의 bacteriolytic enzyme 생성균은 모두 세균이었으며 효모 및 곰팡이는 분리되지 않았다. 이들 분리균주 중 투명환을 형성하는 균주의 H/C ratio(투명환의 직경/집락의 직경)가 4 mm 이상되는 8균주를 선택하여 Nutrient Broth(DIFCO)에 접종하여 30°C에서 24시간 배양하여 균의 생육이 좋고, 균체를 제거한 상등액과 *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698의 균체액을 반응시켜 570 nm에서 측정된 흡광도치가 가장 크게 감소하는 균주인 SH-1을 최종 선발하였으며 SH-1균주의 용균활성은 59.1이었다(Table 1).

Table 1. Comparison of bacteriolytic activities among isolated strains.

Strains	O.D. (660 nm)	Bacteriolytic activity (Units/ml)
Strain No. SH-1	1.98	59.1
SH-2	1.78	41.6
SH-3	1.27	48.2
SH-4	1.36	32.4
SH-5	1.12	31.2
SH-6	0.97	34.7
SH-7	1.58	51.2
SH-8	2.05	48.7

Cultivation was carried out at 30°C for 24 hr on a shaking incubator.

형태적 특성

SH-1균주는 면양 혈액 한천배지상에서의 용혈성은 인식되지 않았으며 nutrient agar plate 상에서 배양하여 형성된 집락의 특성에 대하여 조사한 결과는 Table 2와 같다. Finley와 Fields의 배지(27) 상에서 접종하여 30°C에서 16시간 배양한 후 현미경으로 형태적 특성을 관찰한 결과는 Table 3과 같으며, 편모 염색 결과 주모성편모를 가지고 있었으며 india ink법으로 협막 염색을 한 결과 협막은 없는 것으로 나타났다. 한편 본 분리균주의 spore의 위치가 paracentral로 나타나 spore의 형태에 근거한 Gordon 등(12)의 분류에 의하면 본 분리균은 Morphological group I(*B. megaterium*, *B. cereus* group, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. firmus*, *B. coagulans*)에 속하는 것으로 판단되었다. Fig. 1은 분리균주 SH-1의 전자현미경 사진으로, 세포벽의 두께가 23 nm로 나타나 gram 양성균임을 확인할 수 있었다.

지방산의 조성

지질은 박테리아의 세포막과 세포벽의 주요한 구성인자로 장쇄 지방산을 포함하고 있으며 그 조성은 각각의 생물이 지닌 지방산 생합성계에 따라 특징이 있고 특히 세균에 있어 그 차이는 상당하다. 지방산

Table 2. Cultural characteristics of the isolated strain SH-1 on the nutrient agar plate.

Content	Characteristics
Size (diameter)	4~5 mm
Shape	Irregular
Elevation	Flat
Margin	Erose
Color	White
Surface appearance	Rough
Density	Opaque
Consistency	Friable

Cultivation was carried out at 30°C for 24 hours.

Table 3. Morphological characteristics of the isolated strain SH-1.

Content	Characteristics
Gram stain	Positive
Shape of a cell	Rod
Width of a cell (μm)	0.8
Length of a cell (μm)	2.8
Spore shape	Ellipsoidal
Spore position	Paracentral
Motility	Motile

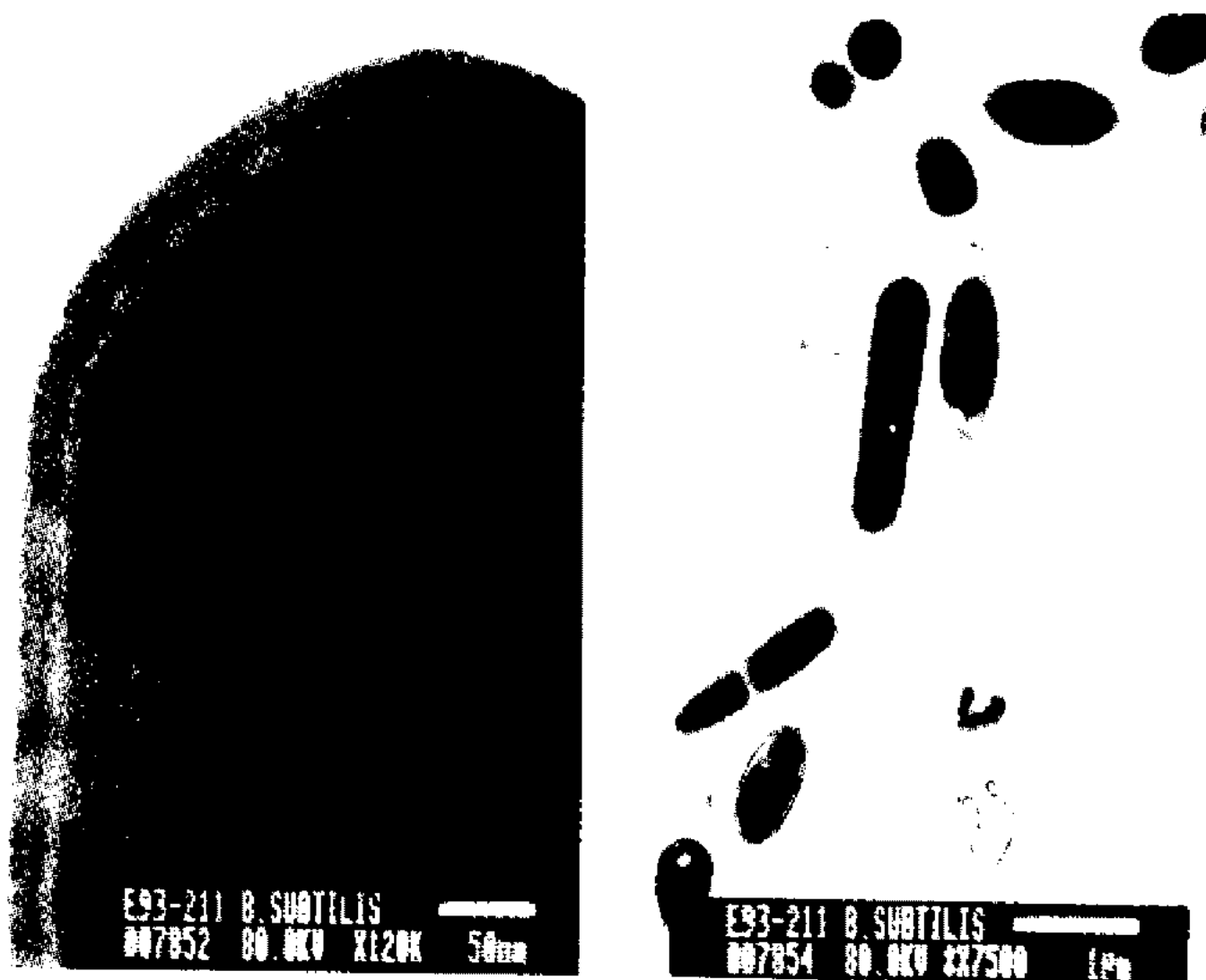
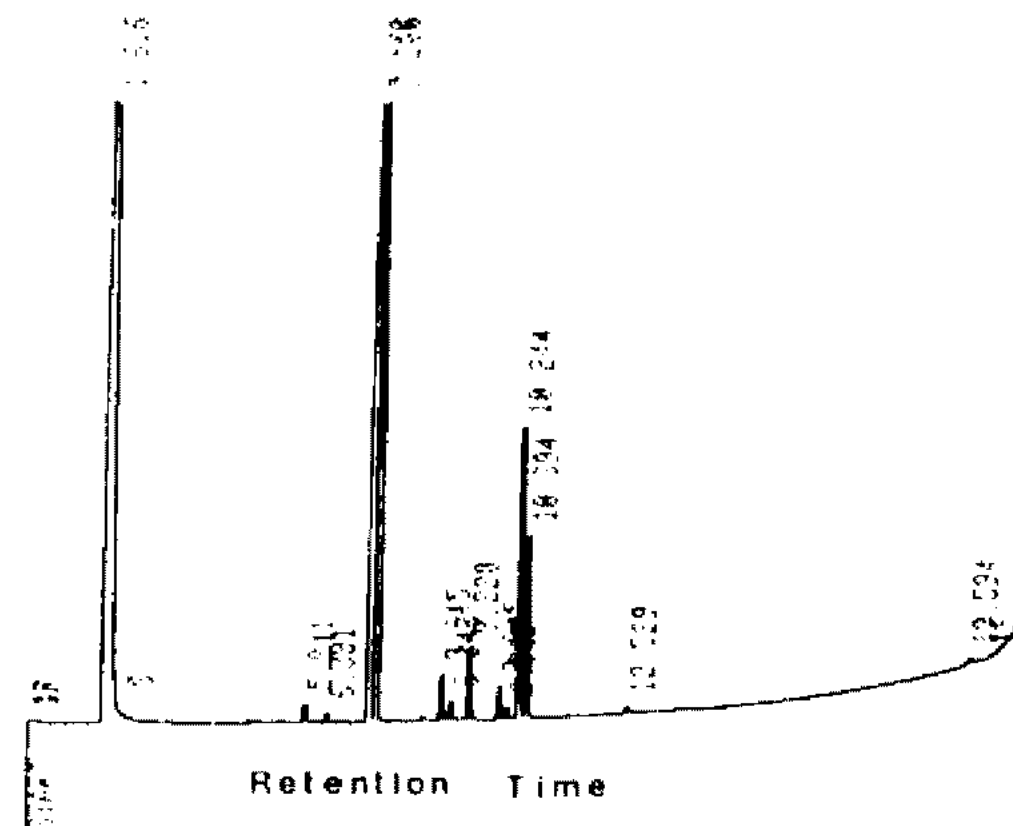


Fig. 1. Transmission electron microphotograph of the isolated strain SH-1. left: 120,000X, right: 7,500X

조성은 분류학상의 단위, 예를 들면 종 수준에서 특징이 확실한 분류군도 있으므로 균체의 지방산 조성을 조사함으로써 그 분류학상의 위치를 알 수 있다. 따라서 분리 균주 SH-1의 지방산 조성을 분석한 결과는 Fig. 2와 같이 측쇄사슬인 iso-Cn과 anteiso-Cn이 대부분으로 gram 양성균에서 볼 수 있는 특징을 가지고 있었으며(28, 29) 특히 측쇄사슬의 전체조성이 93.85%로 나타나, 분리균주 SH-1이 *Bacillus* sp.에 속하는 균주임을 더욱 뒷받침해주고 있었다(21, 30-32) 또한 Kaneda의 이론(28)에 따르면 불포화지방산이 현저하지 않거나 아주 적고(<3%), anteiso-C₁₅ acid와 iso-C₁₅ acid가 각각 26~60%, 13~30%로 사슬의 길이는 14~17이면 group A(*B. alvei*, *B. brevis*, *B. circulans*, *B. licheniformis*, *B. marcerans*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. subtilis*)에 속한다고 하였다. 본 실험의 결과와 비교해 볼 때 지방산 조성의 함량에 있어서는 anteiso-C₁₅ acid와 iso-C₁₅ acid가 각각 32.13%와 30.96%로 group A 속하였으며 지방산의 길이에 있어서는 C₁₈이 0.41%로 소량 존재하여 의문을 제기하였으나 Sehgal 등(33)은 박테리아에서 지방산이 현저하게 나타나는 조성은 분류에 있어 아주 중요한 인자라고 하였다. 따라서 본 분리 균주는 Kaneda의 지방산 분류 group(A~F)중 group A에 가장 가까운 균주임을 알 수 있었다.

분리균주의 동정

분리균주의 동정과 대조균주의 확인을 위하여 *Bacillus* species의 동정에 최근 이용되고 있는 API system (API 50CHB & API 20E)을 kit system의 방법에 따라



RT	Area	Area%	Response	ECL	Name	Z	Comment 1	Comment 2
1.616	3520800	0.070	...	7.029	SOLVENT PEAK	...	Comment 1	
5.841	1812	0.036	0.989	13.617	14:0 ISO	0.89	ECL deviates -0.001	Reference -0.001
6.301	857	0.035	0.978	14.001	14:0	0.42	ECL deviates 0.001	Reference -0.002
7.160	51671	0.037	0.964	14.621	15:0 ISO	30.96	ECL deviates 0.000	Reference -0.002
7.286	67257	0.038	0.962	14.712	15:0 ANTEISO	32.13	ECL deviates 0.001	Reference -0.001
8.645	4858	0.039	0.916	15.625	16:0 ISO	2.28	ECL deviates -0.001	Reference -0.004
8.843	1970	0.041	0.945	15.754	16:1 w/1c	0.92	ECL deviates -0.003	
9.220	8223	0.041	0.942	15.999	16:0	3.85	ECL deviates -0.001	Reference -0.001
9.815	3751	0.043	0.938	16.384	ISO 17:1 w/1c	1.75	ECL deviates -0.003	
9.989	1197	0.044	0.937	16.472	Sum in Feature 5	0.56	ECL deviates -0.004	17:1 ISO 1/ANTEI B
10.214	34367	0.042	0.936	16.629	17:0 ISO	15.98	ECL deviates 0.000	Reference -0.003
10.394	21221	0.042	0.936	16.721	17:0 ANTEISO	9.86	ECL deviates -0.001	Reference -0.004
12.529	981	0.046	0.934	18.000	18:0	0.41	ECL deviates 0.000	Reference -0.004
19.594	266370	1.953	...	22.177
19.999	1197	SUPPED FEATURE 5	0.56	12:1 ISO 1/ANTEI B	17:1 ANTEISO 8/1 I

Solvent	Area	Named Area	Z	Named	Total Amt	Mbr Ref	ECL Deviation	Ref ECL	Shift
35208000	211061	211061	100.00	201340	9	0.002	0.003		

Fig. 2. A gas liquid chromatogram for the analysis of fatty acids of strain SH-1.

조작하여 ATB computer data base version 2.0으로 판독한 결과 95% 이상의 유사도로 "Good identification" 이상으로 받아들여지고 있으므로 모두 표준 균주임이 확인되었다. 그리고 분리균주 SH-1에 대한 ATB system의 결과 99.5%의 *B. subtilis*로 "Very good identification"으로 나타나고 있어 본 분리균주는 *Bacillus subtilis*로 동정되어졌으며 분리균주와 대조균주에 대한 API system의 항목과 그 외 방법에서의 생화학적 특성을 조사한 결과를 Table 4에 나타내었다. Table 4에서와 같이 본 분리균주는 12% NaCl이 함유된 배지에서도 생육하였으며 생육온도는 50°C까지 생육하는 호기성 균주였으며 가수분해활성에 있어서는 starch, gelatin, casein 등을 분해하였고, catalase, oxidase 등을 생산하였으나 urease, indole 등은 생산하지 않았다.

한편 표준균주인 *Bacillus subtilis*와 달리 D-xylose, sorbitol 및 D-turanose 분해능이 없었으며 acetate 이용능 등이 없는 다소의 상반되는 결과를 보여주고 있어 이러한 결과를 보다 명확하게 하기 위하여 Sneath와 Sokal(24)의 S_j coefficient를 사용하여 82가지의 형질(character)을 조합하여 산출해 보면 분리균주에 대한 대조균주들과의 유사도지수는 *Bacillus*

Table 4. Biochemical characteristics of the isolated and reference strains.

Test	* SH-1	ATCC 6633	ATCC 11778	ATCC 25848	ATCC 23845	ATCC 21037
API 50CHB						
1. Glycerol (GLY)	+	+	-	+	+	+
2. Erythritol (ERY)	-	-	-	-	-	-
3. D-Arabinose (DARA)	-	-	-	-	-	-
4. L-Arabinose (LARA)	+	+	-	+	+	+
5. Ribose (RIB)	+	+	+	+	+	+
6. D-Xylose (DXYL)	-	+	-	+	-	+
7. L-Xylose (LXYL)	-	-	-	-	-	-
8. Adonitol (ADO)	-	-	-	-	-	-
9. β -Methyxcycloside (MDX)	-	-	-	-	-	-
10. Galactose (GAL)	-	-	-	+	-	+
11. D-Glucose (GLU)	+	+	+	+	+	+
12. D-Fructose (FRU)	+	+	+	+	+	+
13. D-Mannose (MNE)	+	+	-	-	+	+
14. L-Sorbose (SBE)	-	-	-	-	-	-
15. Rhamnose (RHA)	-	-	-	-	-	-
16. Dulcitol (DUL)	-	-	-	-	-	-
17. Inositol (INO)	+	+	-	-	-	+
18. Mannitol (MAN)	+	+	-	+	+	+
19. Sorbitol (SOR)	-	+	-	+	+	+
20. α -Methyl-D-mannoside (MDM)	-	-	-	-	-	-
21. α -Methyl-D-glucoside (MDG)	+	+	-	-	+	+
22. N-Acethylglucosamine (NAG)	-	-	+	+	+	+
23. Amygdaline (AMY)	-	-	-	+	+	+
24. Arbutin (ARB)	+	+	+	+	+	+
25. Esculin (ESC)	+	+	+	+	+	+
26. Salicin (SAL)	+	+	+	+	+	+
27. Cellobiose (CEL)	+	+	+	+	+	+
28. Maltose (MAL)	+	+	+	+	+	+
29. Latose (LAC)	-	-	-	+	+	+
30. Melibiose (MEL)	+	+	-	+	+	+
31. Sucrose (SAC)	+	+	+	+	+	+
32. Trehalose (TRE)	+	+	+	+	-	+
33. Inulin (INU)	+	+	-	+	+	+
34. Melezitose (MLZ)	-	-	-	+	-	-
35. D-Raffinose (RAF)	+	+	-	+	+	+
36. Starch (AMD)	+	-	+	+	+	+
37. Glycogen (GLYG)	+	+	+	+	+	+
38. Xylitol (XLT)	-	-	-	-	-	-
39. β -Gentiobiose (GEN)	-	-	-	+	+	-
40. D-Turanose (TUR)	-	+	-	+	+	-
41. D-Lyxose (LYX)	-	-	-	-	-	-
42. D-Tagatose (TAG)	-	-	-	-	-	+
43. D-Fucose (DFUC)	-	-	-	-	-	-
44. L-Fucose (LFUC)	-	-	-	-	-	-
45. D-Arabitol (DARL)	-	-	-	-	-	-
46. L-Arabitol (LARL)	-	-	-	-	-	-
47. Gluconate (2KG)	-	-	-	-	-	-
48. 2-Ketogluconate (2KG)	-	-	-	-	-	-
49. 5-Ketogluconate (5KG)	-	-	-	-	-	-

Table 4. Continued

Test	※ SH-1	ATCC 6633	ATCC 11778	ATCC 25848	ATCC 23845	ATCC 21037
API 20E						
50. Ortho-nitro-phenyl-galactoside (ONPG)	+	+	-	+	+	+
51. Arginine (ADH)	-	-	+	-	-	-
52. Lysine (LDC)	-	-	-	-	-	-
53. Ornithine (ODC)	-	-	-	-	-	-
54. Sodium citrate (CIT)	-	-	-	-	-	-
55. Sodium thiosulfate (H ₂ S)	-	-	-	-	-	-
56. Urease (URE)	-	-	-	-	-	-
57. Tryptophane desaminase (TDA)	-	-	-	-	-	-
58. Indole (IND)	-	-	-	-	-	-
59. Sodium pyruvate (VP)	+	+	+	-	+	-
60. Gelatinase (GEL)	+	+	+	+	+	+
Conventional method						
61. Growth on MacConkey agar	-	-	-	-	-	-
62. Haemolysis on sheep blood agar	-	-	+	-	+	-
63. Cell width > 1.0 μm	-	-	+	+	-	-
64. Cell length > 3.0 μm	-	-	+	-	-	-
65. Motility	+	+	+	+	+	+
66. Spores ellipsoidal	+	+	+	+	+	+
67. Spores central or paracentral	+	+	+	+	+	+
68. Anaerobic growth	-	-	+	-	-	+
69. Gas form glucose	-	-	-	-	-	-
70. Catalase	+	+	+	+	+	+
71. Oxidase	+	+	+	-	+	+
72. Egg-yolk lecithinase	-	-	+	-	-	-
73. Hydrolysis of casein	+	+	+	+	+	+
74. Growth at pH 6.8, nutrient broth	+	+	+	+	+	+
75. Growth at pH 5.8, nutrient broth	+	+	+	+	+	+
76. Growth at 10°C	-	-	-	+	-	-
77. Growth at 50°C	+	+	-	+	-	+
78. Growth at 55°C	-	-	-	-	-	+
79. Growth in NaCl 0%	+	+	+	+	+	+
80. Growth in NaCl 8%	+	+	+	+	+	+
81. Growth in NaCl 10%	+	+	-	+	+	+
82. Growth in NaCl 12%	+	+	-	+	-	+

+: Positive reaction, -: Negative reaction

※ SH-1; Isolated strain, ATCC6633; *Bacillus subtilis*, ATCC11778; *Bacillus cereus*, ATCC25848; *Bacillus megaterium*, ATCC23845; *Bacillus amyloliquefaciens*, ATCC21037; *Bacillus licheniformis*

subtilis(90.0%), *Bacillus licheniformis*(78.3%), *B. amyloliquefaciens*(75.0%), *Bacillus megaterium*(66.7%), *B. cereus*(54.5%)의 순으로 나타났다. 이러한 결과를 유사도의 수지도(dendrogram)를 Fig. 3에 나타난 바와 같이 *Bacillus subtilis* group 내의 *Bacillus subtilis*와 유사도지수가 가장 높은 것으로 나타났다.

또한 생화학적 제특성을 수치 분류화한 동일 cluster-group 내의 균주들은 상호간 형질의 특성이 유사

하게 나타나고 있으므로 이들 group간의 중요시험이 되는 형질의 특성을 조사하여 분류학상의 위치를 검토하였다. 지방산조성 형식에 의한 Kaneda의 group A에 속하는 균주중 *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus*는 생화학적 제특성을 수치 분류화한 priest 등(17)의 cluster-group 5B와 Logan & Berkely의 cluster-group IV에 속하는 균주로 이것을 *Bacillus subtilis* group이라고 하였다. *B. marce-*

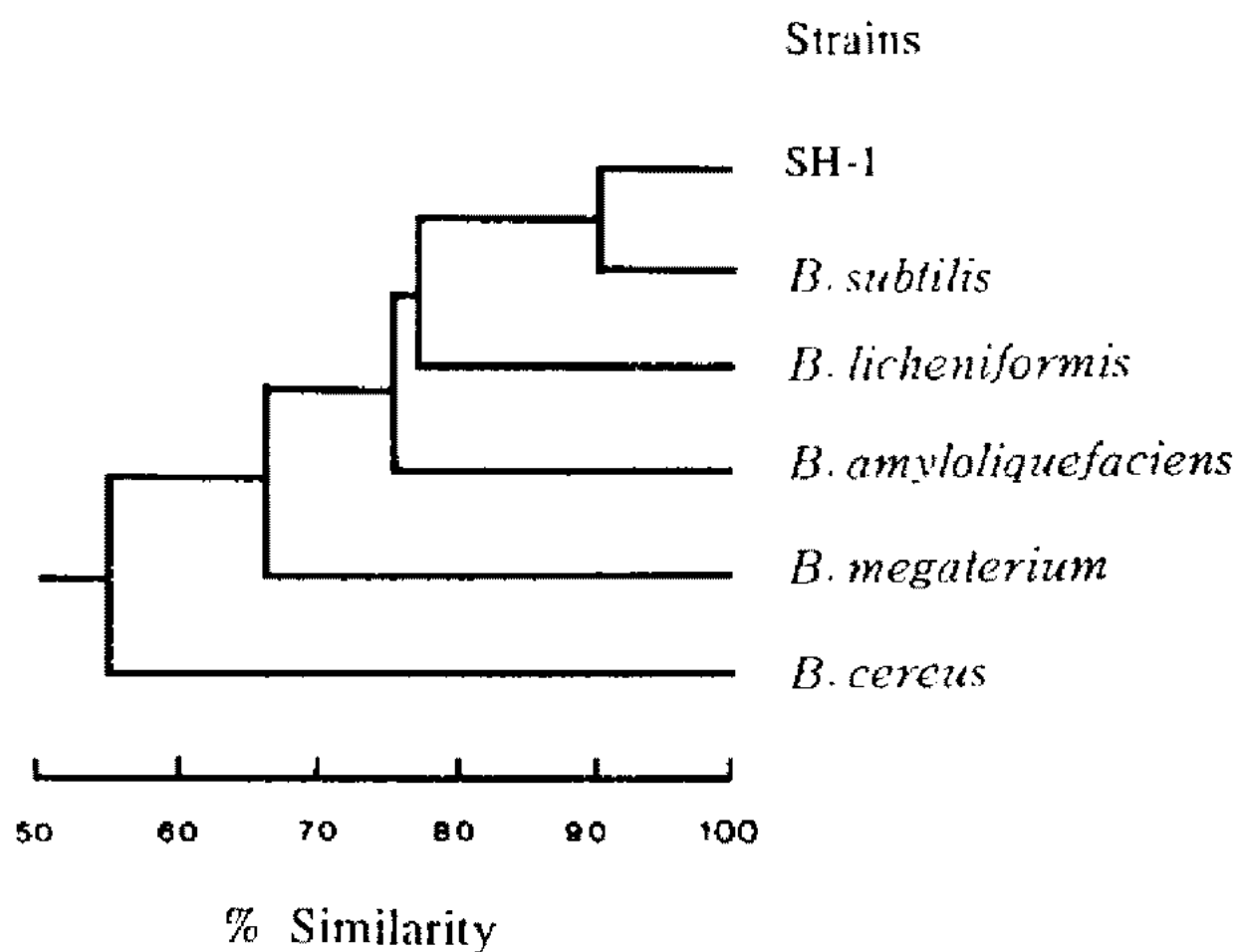


Fig. 3. A dendrogram showing the relationship among *Bacillus* strains based on the SJ coefficient.

ans, *B. circulans*, *B. alvei*, *B. brevis*는 Priest 등(17)과 Logan & Berkely(13)의 다른 분류 group에 속하는 균주였다.

Priest 등(17)에 의하면 *B. alvei*, *B. marcerans*, *B. circulans*, *B. brevis*는 spore의 위치가 말단이었으며 pH 4.5에서와 NaCl 10% 농도에서는 생육이 되지 않으며 대부분의 gram 양성균들은 생육이 억제되는 MacConkey agar에서도 이들 균들은 생육하는 것으로 나타나 본 분리 균주와의 결과와 상반되는 결과를 나타내어 이들은 아님을 알 수 있었으며 또한 *B. marcerans*는 glucose로부터 gas 생성능이 있으며 *B. alvei*는 indole을 생성하여 이 또한 아님을 알 수 있었다.

한편 Sneath(11)에 의하면 *B. alvei*와 *B. brevis*는 10°C에서는 생육을 하지 않으며 L-Arabinose의 탄수화물로부터 산을 생성하지 않는다고 하여 본 분리균주와 상반되는 결과를 나타내었다. 따라서 본 분리균주를 중요시험을 중심으로 검토한 결과 strain SH-1은 *Bacillus subtilis* group인 Priest 등의 cluster-group 5B와 Logan & Berkeley의 cluster-group IV에 속함을 알 수 있었다. 또한 ODonnell 등(19)이 *Bacillus subtilis* group 내에서 생화학적 제특성의 구분이 힘든 *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. subtilis*에 대한 API system을 이용하여 수리분류화합으로서 그 특징을 명확히 한 결과에 의하면 *B. pumilus*는 key test가 되는 질산염 환원능이 없었으며 glycogen과 starch의 가수분해능이 없는 것으로 나타나 본 분리균주와 상이한 결과를 보여 *B. pumilus*는 아님을 알 수 있었다. 따라서 이상의 균학적 제성질을 분석하여 분류학상의 위치를 검토한 결과 분리주 SH-1은 *Bacillus subtilis*로 동정되었다.

요 약

해양에서 용균효소를 생산하는 균주를 분리 동정하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 부산 연안해수로부터 분리한 43여종의 용균효소를 분비하는 균주중 Nutrient broth에서 균의 생육이 좋고 배양상등액이 *Micrococcus lysodeikticus*의 cell과 반응하여 용균능력이 우수한 균주인 SH-1을 선별하였다. 분리주 SH-1은 gram 양성균의 내아포를 형성하는 간균이었으며 spore의 위치가 paracentral로 나타나 Gordon의 morphological group I에 속함을 알 수 있었다. SH-1 균체의 지방산 조성은 branched chain인 iso-Cn과 anteiso-Cn이 주 성분이었으며 이들 branched chain 조성의 전체합이 93.85%로 나타나 *Bacillus* sp.에 속하는 균주임을 알 수 있었다. API system(API 50CHB & API 20E)을 이용한 분리주 SH-1의 동정결과 *Bacillus subtilis*로 동정되었다. *Bacillus subtilis* group에 속하는 균주를 대조균주로 하여 82가지의 형질 특성을 조사하여 수리 분류법에 의한 동정결과 *Bacillus subtilis* group 내 *Bacillus subtilis*와 90.0%의 유사성을 나타내었다. 이상의 균학적 제성질을 조사하여 분류학상의 위치를 검토한 결과 분리주 SH-1은 *Bacillus subtilis*로 동정되었다.

참고문헌

1. Ghuysen, J.M. 1968. Use of bacteriolytic enzymes in determination of wall structure and their role in cell metabolism. *Bacteriol. Rev.* 32: 425-464.
2. Sugahara, I., T. Kimura, K. Hayashi, and I. Nakajima. 1988. Distribution and generic composition of lytic enzyme-producing bacteria in coastal and oceanic bottom sediments. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 54: 1011-1015.
3. Sugahara, I., T. Kimura, Y. Nakagawa, H. Kojima, M. Usuda, and M. Tanaka. 1990. Lytic enzyme-producing bacteria in marine bottom sediments. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 56: 511-518.
4. Sugahara, I., L.R. Berger, T. Kimura, and K. Hayashi. 1988. Effect of Temperature and pressure on the lytic and autolytic activities of *Bacillus* sp. V37 isolated from coastal regions. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 54: 861-867.
5. Avakyan, A.A., L.N. Levina, and I.B. Pavlova. 1965. structure and composition of *Bacillus anthracis* capsule. *J. Bacteriol.* 90: 1082-1095.
6. Gerhardt, P. 1967. Cytology of *Bacillus anthracis*. *Fed-proc.* 26: 1504-1517.
7. Abel, K., H. deShmertzing, and J.I. Peterson. 1963. Classification of microorganism by analysis of

- chemical composition. I. Feasibility of utilizing gas chromatography. *J. Bacteriol.* **85**: 1039-1044.
8. Miller, L., and T. Berger. 1985. Bacteria identification by gas chromatography of whole cell fatty acid. Hewlett-Packard Application Note, Pp. 228-248.
 9. MacFaddin, J.F. 1980. Biochemical tests for Identification of Medical Bacteria, 2nd ed. Baltimore, Williams and Wilkins.
 10. Cowan, S.T. and Steel K.J. 1974. Manual for the identification of medical bacteria. 2nd ed., Cambridge University press.
 11. Sneath, P.H. 1986. Bergey's manual of systematic bacteriology, Pp. 1104-1138. Vol. 2, Baltimore, Williams and Wilkins co.
 12. Gordon, R.E., W.C. Haynes, and C.H.N. Pang. 1973. The genus *Bacillus* handbook No. 427. U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C.
 13. Logan, N.A. and R.C.W. Berkeley. 1981. Classification and identification of the genus *Bacillus* using API tests, In the Aerobic endospore-forming bacteria: Classification and identification, edited by R.C.W. Berkeley and M. Goodfellow, Pp. 106-140. London and New York, Academic Press.
 14. Logan, N.A. and R.C.W. Berkeley. 1984. Identification of *Bacillus* strains using the API system. *J. Gen. Microbiol.* **130**: 1871-1882.
 15. Keneman, E.W., S.D. Allen, V.R. Dowell, W.H. Jonda, H.M. Sommers and W.C. Winn. 1988. Diagnostics Microbiology, Pp. 355-364. 3th ed. J.B. Lippincott Co.
 16. Turnburn, P.C.B. and J.M. Kramer. 1991. Manual of clinical microbiology, Pp. 296-303. 5th ed. American Society for Microbiol. Washington, D.C.
 17. Priest, F.G., M. Goodfellow, and C. Todd. 1981. The genus *Bacillus*: A numerical analysis. In the aerobic endospore-forming bacteria: Classification and identification, Edited by R.C.W. Berkeley and M. Goodfellow, Pp. 91-103. London and New York, Academic Press.
 18. Priest, F.G.M. Goodfellow, and C. Todd. 1988. A Numerical Classification of the Genus *Bacillus*. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 1847-1882.
 19. O'Donnell, A.G., J.R. Norris, R.C.W. Berkeley, D. Claus, T. Kaneko, N.A. Logan, and R. Nozaki. 1980. Characterization of *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis* and *Bacillus amyloliquefaciens* by pyrolysis gas-liquid chromatography, deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization, biochemical tests and API systems. *International J. Systematic Bacteriol.* **30**: 448-459.
 20. Goodfellow, M. and D.E. Minnikin. 1985. Chemical methods in bacteria systematics. Academic Press. N.Y., Pp. 145-171.
 21. Kaneda, T. 1967. Fatty acid in the genus *Bacillus*. I. Iso- and anteisofatty acid as characteristic constituents of lipid in 10 Species. *J. Bacteriol.* **93**: 894-903.
 22. Kaneda, T. 1977. Fatty acid of the genus *Bacillus*. An example of branched-chain preference. *Bacteriological Reviews.* **41**: 391-418.
 23. Niskaman, A., T. Kiutamo, S. Raisanen and M. Raevuori. 1978. Determination of fatty acid composition of *Bacillus cereus* and related bacteria: A rapid gas chromatographic method using a glass capillary column. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**: 453-455.
 24. Sneath, Peter H.A. and Rober R. Sokal. 1973. Numerical Taxonomy, W.H. Freeman and Company, San Francisco.
 25. Austin, B. and F. Priest. 1986. Modern Bacterial Taxonomy, Van Nostrand Reinhold (UK) Co. Ltd., Berkshire.
 26. Ludwig, Johan A. and James F. Reynolds. 1988. Statistical Ecology, John Willey and Sons, Toronto.
 27. Finley, N. and M.L. Fields. 1962. Heat activation and heat-induced dormancy of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Appl. Microbiol.* **10**: 231-236.
 28. Kaneda, T. 1977. Fatty acid of the genus *Bacillus*. An example of branched-chain preference. *B. Review.* **41**: 391-418.
 29. Rasoamananjaka, D., F. Peladan, J.C. Turlot, H. Monteil and L. Richard. 1985. Characterization of *Flavobacterium* species analysis of volatile fatty acid production. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 2723-2732.
 30. Kaneda, T. 1963. Biosynthesis of branched chain fatty acids. I. Isolation and identification of fatty acids from *Bacillus subtilis* (ATCC 7059). *J. Biol. Chem.* **238**: 1222-1228.
 31. Kaneda, T. 1968. Biosynthesis of long-chain hydrocarbons. II. Studies on the biosynthetic pathway in tobacco. *Biochemistry.* **7**: 1194-1202.
 32. Kaneda, T. 1969. Fatty acids in *Bacillus larvae*, *Bacillus lentimorbis*, and *Bacillus popilliae*. *J. Bacteriol.* **98**: 143-146.
 33. Sehgal, S.N., M. Kates, and N.E. Gibbons. 1962. Lipids of *Halobacterium cutirubrum*. *Can. J. Biochem. Physiol.* **40**: 69-81.

(Received 10 June 1995)